

特集

第33回放射線による制癌シンポジウム

・ 21世紀の放射線治療 :
— 四次元放射線治療の基礎と臨床 —

ヒン・有・重・空間的線量分布と生物学 (A) IMRT と IMRT

Radiation-induced Bystander Effect

松本 英樹^{*1}

Radiation-induced Bystander Effect: Matsumoto H (Dept of Experimental Radiology & Health Physics Fukui Medical Univ School of Medicine)

There has been a recent upsurge of interest in radiation-induced adaptive response and bystander effect, which are specific modes in stress response to low-dose/low-dose rate radiation. Previously we reported that the accumulation of inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) was induced only in human glioblastoma mutant (m) p53 cells by acute irradiation with X-rays, suggesting a suppression of iNOS induction after acute irradiation with X-rays in wild-type (wt) p53 cells. NO secreted from the irradiated mp53 cells induced the accumulation of p53 in unirradiated wtp53 cells. The radiosensitivity of wtp53 cells was reduced by exposure to the conditioned medium from irradiated mp53 cells, suggesting that NO is an initiator of radiation-induced bystander effects.

Recently, we found that the accumulation of iNOS in wtp53 cells was induced by chronic irradiation with gamma rays followed by acute irradiation with X-rays, but not by each one, resulting in an increase in nitrite concentrations of medium. It is suggested that the accumulation of iNOS may be due to the depression of acute irradiation-induced p53 functions by pre-chronic irradiation. We found that the radiosensitivity of wtp53 cells against acute irradiation with X-rays was reduced after chronic irradiation with gamma rays. This reduction of radiosensitivity of wtp53 cells is just radiation-induced adaptive response, suggesting that NO-mediated bystander effect may considerably contribute to adaptive response induced by radiation.

Key words: Bystander effect, Adaptive response, Hyperradiosensitivity, nitric oxide, p53

Jpn J Cancer Clin 50(13): 1075~1079, 2004

はじめに

近年、照射装置の進歩・照射方法の工夫により、放射線癌治療において低線量あるいは低線量率放射線被曝の問題が唱えられつつある。治療期間の短縮・生物効果の不均一性の克服を考慮した密封小線源による組織内照射では、低線量率連続照射が行われている。強度変調放射線治療

(IMRT)においても、線量率から考えると場合によっては低線量率照射となることがあり、また周囲の正常組織に低線量被曝域が存在している。これらの放射線癌治療における低線量・低線量率照射および被曝が新たな問題を浮き彫りにしてくる可能性が考えられる。

このような背景を踏まえて、低線量放射線に対する細胞応答現象の中で、最近注目されている、Hyper-radiosensitivity (HRS), Increased radio-resistance (IRR), 放射線適応応答および放射線誘発バイスタンダー効果との関連性について概説

^{*1} 福井大学医学部国際社会医学講座放射線基礎医学領域

する。

1. Hyper-Radiosensitivity (HRS) および Increased Radioresistance (IRR)

LQモデルによる細胞の放射線感受性を線量-生存率曲線で表すと、亜致死的損傷回復によってもたらされる「肩」と呼ばれる曲線が低線量域において認められる。グレイ癌研究所のJoinerらは、1 Gy以下の低線量域の生存率をFACScanによる細胞数の正確な測定技術および播種した細胞をリアルタイムに顕微鏡下で観察する技術を用いて精査することにより、0~0.5 Gyでは急激な生存率の低下が認められ、0.5~1 Gyでは再び生存率の回復が起こり、1 Gy以上ではLQモデルの生存率に一致してくるという現象を見出した。彼らは、0~0.5 Gyでの急激な生存率の低下をHRS、0.5~1 Gyでの生存率の回復をIRRと呼んだ¹⁾ (図1)。HRSおよびIRRは、ほぼすべての細胞に認められる普遍的な現象と考えられる。さらに彼らはHRSおよびIRRにも適応応答があるのか否かを検討し、0.2 Gyの前照射と本照射との間のインターバル時間が6時間では明らかな適応応答によるHRSおよびIRRが消失することを見出した²⁾。これらの結果より、0~0.5 Gyの線量範囲で認められるHRSは、損傷が小さいために修復系の誘導が起こらないために誘引される致死効果の現れで、0.5~1 Gyの線量範囲で認められるIRRは、DNA損傷が認識され、修復系の誘導が起こるために現れ、1 Gy以上においては、損傷量が修復量を上回るために起こる致死効果として結論付けている。

2. 放射線適応応答

放射線適応応答はほぼ20年前の1984年にWolfららがヒトリンパ球の染色体異常の誘発に関する研究から見出した現象である³⁾ (図2)。その後、異なった細胞系を用いて彼らの発見を支持する結果がいくつか報告された。この放射線適応応答は哺乳動物の培養細胞および個体双方において観察されることは周知の事実であり、染色体異常、突然変異、放射線感受性等の様々な生物現象

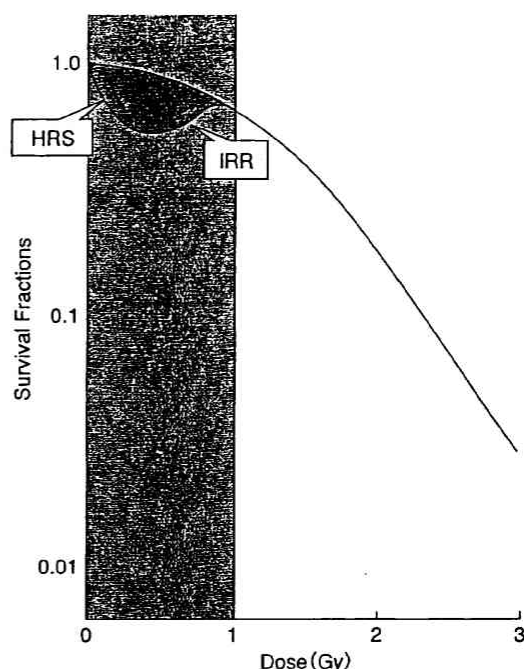


図1 Hyper-Radiosensitivity (HRS) と Increased Radioresistance (IRR)

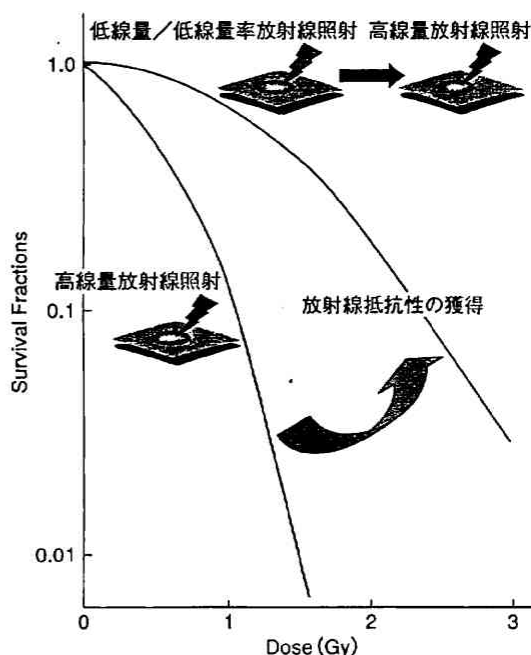


図2 放射線適応応答

において確認されている³⁻⁶⁾。米澤らはマウスを用いた実験から、①0.025 Gy以下では適応応答

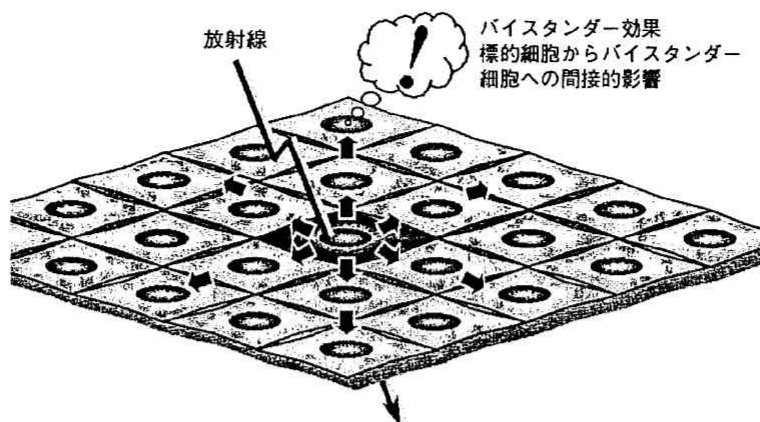


図3 放射線誘発バイスタンダー効果

は誘導されなかった, ② 0.05~0.1 Gy では2~2.5 カ月後の半月間に適応応答による放射線抵抗性の獲得が認められた, ③ 0.15~0.2 Gy では再び適応応答は誘導されなかった, ④ 0.3~0.5 Gy では2週間後に適応応答による放射線抵抗性の獲得が認められたと報告している⁵⁾。

今のところ放射線適応応答の誘導メカニズムは明らかにされていないが, いくつかの仮説が提唱されている。佐々木は, 放射線適応応答に PKC の活性化が必須であることを示すと共に PKC によるタンパク質のリン酸化がもたらす細胞内シグナル伝達経路が低線量放射線によって誘導される細胞内シグナル伝達系のキーステップであり, このシグナル伝達系には p53 および PI3K の機能が関与することを示した⁷⁾。高橋は, 正常型 p53 細胞において高線量率放射線単独照射で観察される p53 の蓄積・活性化およびアポトーシスの誘導が予め低線量率放射線照射によって顕著に抑制されることを見出し, これが放射線適応応答のメカニズムの一つであることを提唱した⁸⁾。

3. 放射線誘発バイスタンダー効果

1992 年, Nagasawa と Little が非標的細胞における DNA 損傷によらない間接的な放射線影響について報告したのが放射線誘発バイスタンダー効果の最初の論文⁹⁾であり, その後多くの放射線誘発バイスタンダー効果に関する論文が報告されているが, そのほとんどが低線量の α 粒子を用

いた実験である。放射線誘発バイスタンダー効果においても, 放射線適応応答と同様に, 細胞死の亢進, 姉妹染色分体交換, 染色体不安定性, 突然変異, 細胞内活性酸素種の増加, p53 細胞内含有量の増加あるいは減少等様々な生物現象が観察されている。しかしながら放射線誘発バイスタンダー効果は細胞レベルにおいて認められているのみで個体レベルでは認められていない (図3)。

放射線誘発バイスタンダー効果のメカニズムは十分に明らかにされていないが, 放射線に直接曝露された標的細胞とそうでない非標的細胞 (バイスタンダー細胞) 間のシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることは容易に想像がつく。隣接する細胞間での低分子物質の交換に関わっているのがギャップ結合である。ある細胞を低線量放射線が通過すると放射線応答シグナルによる化学反応が誘発され, その反応産物 (バイスタンダー因子) が隣接するバイスタンダー細胞へギャップ結合を通じて移行し, バイスタンダー効果が誘発されるというモデルが提唱されている¹⁰⁾。もう一つの隣接する細胞同士の結合様式としてリガンドとその受容体による結合があり, これによっても放射線誘発バイスタンダー効果が生まれる可能性が考えられる。標的細胞とバイスタンダー細胞間での Fas および Fas リガンドによるアポトーシス誘導はこのモデルの典型であるが¹¹⁾, 1 Gy 以下の低線量放射線による Fas あるいは Fas リガンドの誘導は報告されていない。

隣接せず離れた場所に存在する細胞間でのバイスタンダー効果の誘発には、放射線に曝露された標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子が関与していることが報告されている。Mothersill と Seymour は、0.5 Gy の γ 線を照射した細胞のコンディショニング培地 (irradiated conditioned medium, ICM) への曝露によるバイスタンダー細胞の生存率の低下を見出し、標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子がタンパク質様の生理活性物質であることを示した¹²⁾。Lehnert らは、8.4 cGy の α 粒子を照射された標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子が活性酸素種、TNF- α あるいは TGF- β 1 である可能性を示した^{13,14)}。Barcellos-Hoff らも標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子が TGF- β 1 の可能性を示唆している¹⁵⁾。筆者らは、バイスタンダー因子の一つが内因性の nitric oxide (NO) であることを見出している^{16,17)}。

4. 放射線適応応答へのバイスタンダー効果の寄与

高 LET 放射線では放射線適応応答は認められないと理解されている。また高線量の電離放射線への曝露に先だって予め低線量の電離放射線に直接曝露された細胞集団が放射線適応応答の実験対象であった。一方、今まで報告されてきた放射線誘発バイスタンダー効果は、細胞の生存に悪影響を与える現象がほとんどであり、また高 LET および低 LET 放射線いずれにおいても認められる現象であるために細胞の生存を促す放射線適応応答とは無縁の現象として捉えられていた。このような研究背景を再考すると2つの疑問が生じてくる。一つは、本当に高 LET 放射線では放射線適応応答は認められないのであろうかという疑問である。もう一つは、ある細胞集団を低線量放射線に曝露させた場合、直接放射線が細胞内を通過した細胞と全く放射線が通過していない細胞の両者が存在する可能性が考えられ、そのような環境下で対象となっているすべての細胞において放射線適応応答が誘導されていると考えたと放射線抵抗性の獲得に放射線誘発バイスタンダー効果が大

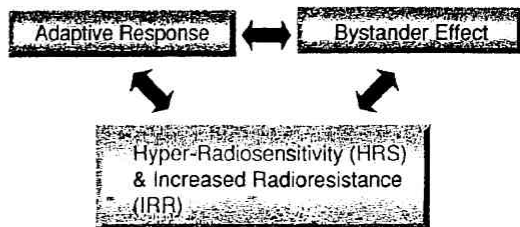


図4 低線量放射線に対する特異的な応答現象

きく寄与しているのではないかという疑問である。最近、放射線誘発バイスタンダー効果にも細胞の生存に有利な現象も存在することを示す知見が蓄積されてきている。筆者らは、高および低 LET 放射線 (炭素線および X 線) が誘発するバイスタンダー効果によりバイスタンダー細胞に放射線抵抗性が誘導されることを見出し、内因性 NO がバイスタンダー因子であることを示した^{16,17)}。また正常型 p53 細胞を低線量率放射線照射に引き続いて高線量率放射線照射すると p53 の蓄積および活性化が抑制され、iNOS の誘導が起こり、NO が産生されることを見出している。Shao らは、1 Gy 以上の高 LET および低 LET 放射線 (炭素線および X 線) が誘発するバイスタンダー効果によるバイスタンダー細胞の生着率の上昇および微小核形成率の低下を見出し、NO がバイスタンダー因子であることを示した¹⁸⁾。Iyer らは、低線量の α 粒子を照射した細胞の培養液をバイスタンダー細胞に曝露し、放射線抵抗性が誘導されることを見出した¹⁹⁾。したがって、放射線適応応答による放射線抵抗性の獲得に内因性 NO を介したバイスタンダー効果が関与している可能性が示唆される。

まとめ

以上、HRS・IRR、放射線適応応答および放射線誘発バイスタンダー効果を概説すると共に、それらの関連性について述べた。低線量放射線に特有の応答現象は、これらの相互作用によりもたらされる現象であるように思える (図4)。

米国をはじめ英国や日本でもマイクロビーム放射線照射装置が開発されており、今後マイクロビーム放射線を用いた研究成果が蓄積されること

により, HRS・IRR, 放射線適応応答および放射線誘発バystander効果の詳細なメカニズムが解明されていくことが期待される。

文 献

- 1) Joiner MC, Marples B, Lambin P, et al: Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 379-389, 2001
- 2) Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, et al: Hypersensitivity to very-low dose single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat Res* 358: 171-183, 1996
- 3) Olivieri G, Bodycote J, Wolff S: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223: 594-597, 1984
- 4) Cai L, Liu SZ: Induction of cytogenetic adaptive responses of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 58: 187-194, 1990
- 5) Yonezawa M, Misonoh J, Hosokawa Y: Two-types of X-ray-induced radio-resistance in mice: Presence of 4 dose ranges with distinct biological effects. *Mutat Res* 358: 237-243, 1996
- 6) Wolff S: The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. *Environ Health Perspect* 108: 277-283, 1998
- 7) Sasaki MS: On the reaction kinetics of the radioadaptive response in cultured mouse cells. *Int J Radiat Biol* 68: 281-291, 1995
- 8) Takahashi A: Different inducibility of radiation- or heat-induced p53-dependent apoptosis after acute or chronic irradiation in human cultured squamous cell carcinoma cells. *Int J Radiat Biol* 77: 215-224, 2001
- 9) Nagasawa H, Little JB: Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 52: 6394-6396, 1992
- 10) Azzam EI, de Toledo SM, Little JB: Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 473-478, 2001
- 11) Albanese J, Dainiak N: Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: Implications for apoptosis and intercellular signaling. *Radiat Res* 153: 49-61, 2000
- 12) Mothersill C, Seymour CB: Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: Evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into medium. *Radiat Res* 149: 256-262, 1998
- 13) Lehnert BE, Goodwin EH: Extracellular factor(s) following exposure to a particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* 57: 2164-2171, 1997
- 14) Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE: Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 57: 3963-3971, 1997
- 15) Barcellos-Hoff MH, Brooks AL: Extracellular signaling through the microenvironment: A hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res* 156: 618-627, 2001
- 16) Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, et al: Induction of radioresistance to accelerated carbon-ion beams in recipient cells by nitric oxide excreted from irradiated donor cells of human glioblastoma. *Int J Radiat Biol* 76: 1649-1657, 2000
- 17) Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, et al: Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. *Radiat Res* 155: 387-396, 2001
- 18) Shao CL, Aoki M, Furusawa Y: Medium-mediated bystander effects on HSG cells co-cultivated with cells irradiated by X-rays or a 290 MeV/u carbon beam. *J Radiat Res* 42: 305-316, 2001
- 19) Iyer R, Lehnert BE: Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat Res* 157: 3-7, 2002